

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 6月26日

出願番号 Application Number: 特願2003-183610

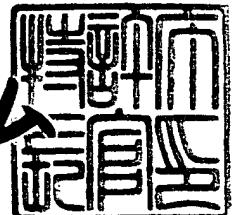
リ条約による外国への出願
用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
country code and number
of our priority application,
used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出願人
Applicant(s): サントリー酒類株式会社

2010年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

細野哲弘



出証番号 出証特2010-3013447

【書類名】 特許願
【整理番号】 S07J1113
【提出日】 平成15年 6月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 7/00
C12N 1/14

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市衣川2-15-5
【氏名】 前田 满

【発明者】

【住所又は居所】 京都府長岡京市竹の台1-B1-102
【氏名】 中尾 正宏

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院嶋出在家町36
【氏名】 深見 治一

【特許出願人】

【識別番号】 000001904
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍
【電話番号】 06-4796-1300

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0012893

【プルーフの要否】 要

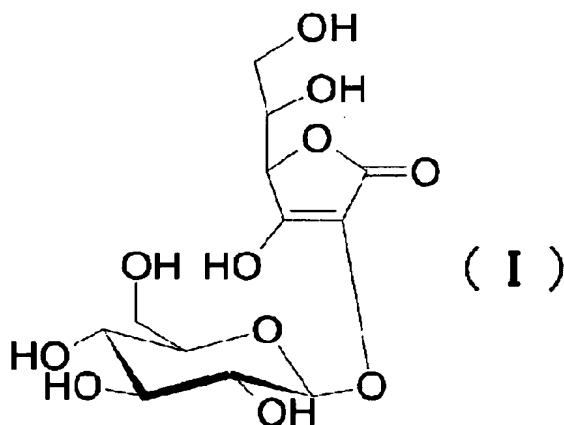
【書類名】 明細書

【発明の名称】 外用組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 (I) で示される 2-O-(β -D-グルコピラノシリル) アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルと麹菌又はその処理物を含有することを特徴とする外用組成物。

【化1】



【請求項 2】 化粧品又は医薬部外品であることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】 植物体から抽出される 2-O-(β -D-グルコピラノシリル) アスコルビン酸を含有することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】 植物体がナス科の植物であることを特徴とする請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】 植物体がクコ、クコの生果あるいは乾燥果実である請求項 3 又は 4 に記載の組成物。

【請求項 6】 麹菌がアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する菌であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】 麹菌が黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*)、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) 又は黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) に属する菌であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項8】 請求項1記載の式(I)で示される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルを含有する組成物と麹菌又はその処理物を含有する組成物とのセット。

【請求項9】 請求項8記載のセット用の2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルを含有する組成物。

【請求項10】 麹菌又はその処理物を含有することを特徴とする2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステル皮膚浸透増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、皮膚外用剤に関し、更に詳細には日焼け後の色素沈着の発生の防止など皮膚に対する優れた美白効果を有する化粧品、医薬部外品等の皮膚外用剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

医薬品、医薬部外品(例えば軟膏剤)、および化粧品(乳液、クリーム、化粧水、パック、ゲル、ファンデーション)等の皮膚外用剤には、これらに所定の薬効を付与することを目的として、薬効成分が加えられている。

例えば、日焼け等により生じる皮膚の黒化、メラニン色素の過剰沈着により生ずるシミ、ソバカス等の現象を防止するために、カラミン等や、L-アスコルビン酸類、ハイドロキノン配糖体、シンナミックアルデヒド、プラセンタエキス等の美白組成物が加えられている。

なかでも、アスコルビン酸類は、安全性が高く、コラーゲン合成を促進し、活性酸素を消去し、テロメア遺伝子の短縮化を抑制し、皮膚組織を誘導する極めて優れた美白因子で、医薬品、化粧品、食品、飼料等に幅広く利用されている。一方で、通常のL-アスコルビン酸の誘導体は酸化分解されやすく、製剤にしても不安定なために、そのままでは実用に耐えるものではなかった。この安定化を目

的に開発された、アルカリイオン水中でのアスコルビン酸誘導体またはその塩の少なくとも1種を含有する組成物（特許文献1）、L-アスコルビン酸2-リン酸塩（特許文献2）、 α -グリコシル-L-アスコルビン酸（特許文献3、特許文献4）が開示されている。その作用・効果は必ずしも満足すべきものではなかった。

すなわち、安定化が確保されたとは言え、特にこれらのアスコルビン酸類及びその誘導体の塩類だけでは吸収性が悪いという課題があった。

また、電気的反発力によるイオン性物質の皮膚深部への浸透を図ったイオントフォーレシス（イオン導入器）、キャビテーション抑制型ソノフォレシス（超音波導入器）、IPL（ストロボ可視光線）などにより、アスコルビン酸の誘導体を皮膚に浸透させやすくする方法がとられてきたが、そのためには特殊な機器を必要とする問題点があった。

【0003】

一方、外用剤組成物中に含有させる経皮吸収促進剤としては、特許文献5に開示されているようなジメチルスルホキド、ジメチルアセトアミド、メチルデシルスルホキシド等のほか、特許文献6に示されているように、低級アルキルアミドと組み合せたもの（例えばジメチルアセトアミドとエチルアルコール、イソプロピルアルコール、イソプロピルパルミテートと組み合わせたもの）や、特許文献7のように2-ピロリドンと適当な油性物質、例えば直鎖脂肪酸と炭素数が2～6のアルコールとのエステルを組み合せたものが知られている。しかるにこれらの公知の経皮吸収促進剤は、いずれも皮膚刺激性を有しており、皮膚に発赤や水腫を生じさせる恐れがある。

【0004】

【特許文献1】

特開2000-351905号公報

【特許文献2】

特開2000-143485号公報

【特許文献3】

特開2002-53450号公報

【特許文献4】

特開2002-121115号公報

【特許文献5】

米国特許第3551554号明細書

【特許文献6】

米国特許第3472431号明細書

【特許文献7】

米国特許第4017641号明細書

【0005】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、安定性に優れ、生体内で持続的に利用され、抗酸化作用が強く、皮膚刺激性が少ないアスコルビン酸誘導体を含み、皮膚浸透性が優れた皮膚外用組成物を提供することを課題とする。

【0006】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記従来技術の課題について種々検討した結果、新規化合物である2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸、その塩及びそのエステル（以下、本発明のアスコルビン酸誘導体とも略称する）の創製に成功し、これらが安定性に優れ、生体内で持続的に利用され、抗酸化作用が強く、皮膚刺激性が少ないと知見した。さらに本発明者らは、本発明のアスコルビン酸誘導体が化粧品又は医薬部外品等皮膚外用剤として有用であることを見出した。さらに本発明者らは、本発明のアスコルビン酸誘導体を皮膚外用剤として用いる場合、本発明のアスコルビン酸誘導体が皮膚に対する浸透性を改善するために種々検討した結果、本発明のアスコルビン酸誘導体と麹菌又はその処理物とを組み合わせて用いると、本発明のアスコルビン酸誘導体の皮膚浸透性が著しく改善されるという思いがけない新知見を得た。すなわち、麹菌又はその処理物が本発明のアスコルビン酸の皮膚浸透性を促進することを見出した。そもそも皮膚は、最外層の約0.01mmの角層、その内側の約0.1mmの表皮とその内側の約0.1~1.3mmの真皮からなり、アスコルビン酸又はアスコルビン酸誘導体を皮

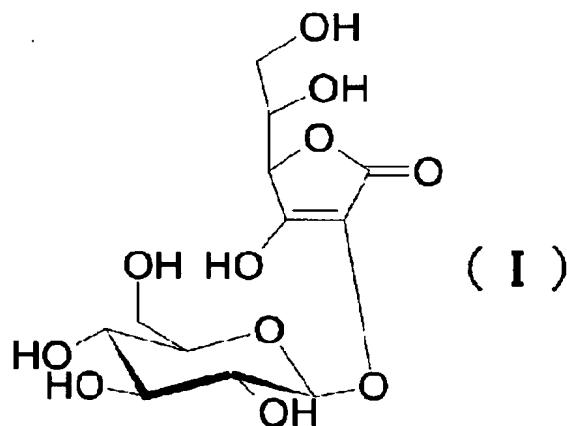
膚に適用しても、皮膚組織への浸透移行性は必ずしも良くない。しかしながら、本発明のアスコルビン酸誘導体と麹菌又はその処理物との組み合わせを皮膚表面に適用すると、本発明のアスコルビン酸誘導体は、すみやかに真皮層にまで吸収され、そこで、徐々にビタミンCに分解され、長期にわたってビタミンCを放出し、生体内での利用率が高い。また、本発明者らは、本発明の新規化合物2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の活性を研究の結果、2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸と比較して安定性が向上し、また生体内で持続的に利用されるなど、プロビタミンCとして極めて有用であることを見出した。

【0007】

すなわち、本発明は、

(1) 式(I)で示される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルと麹菌又はその処理物を含有することを特徴とする外用組成物、

【化2】



(2) 化粧品又は医薬部外品であることを特徴とする上記(1)記載の組成物、

(3) 植物体から抽出される2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を含有することを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の組成物、

【0008】

(4) 植物体がナス科の植物であることを特徴とする上記(3)記載の組成

物、

(5) 植物体がクコ、クコの生果あるいは乾燥果実である上記(3)又は(4)に記載の組成物、

(6) 麦菌がアスペルギルス(*Aspergillus*)属に属する菌であることを特徴とする上記(1)～(5)のいずれかに記載の組成物、

(7) 麦菌が黄麦菌(*Aspergillus oryzae*)、白麦菌(*Aspergillus kawachii*)又は黒麦菌(*Aspergillus awamori*)に属する菌であることを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載の組成物、

【0009】

(8) 上記(1)記載の式(I)で示される2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルを含有する組成物と麦菌又はその処理物を含有する組成物とのセット、

(9) 上記(8)記載のセット用の2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルを含有する組成物、及び、

(10) 麦菌又はその処理物を含有することを特徴とする2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステル皮膚浸透増強剤、

に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明で使用される2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸の製造は、植物又はその処理物から抽出する方法や化学合成による製造方法が挙げられる。植物からの抽出方法は、ナス科植物又はその処理物特にクコ、クコの生果あるいは乾燥果実から抽出することによって行なわれる。本発明のアスコルビン酸誘導体及びそれを含む組成物の好ましい製造方法を下記に例示する。

【0011】

本発明の2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸の合成中間体

は $2-O-(2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸である。中間体である $2-O-(2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸は以下のようにして合成することができる。すなわち、市販されている $5, 6-O$ -イソプロピリデンアスコルビン酸を文献既知 (J. Med. Chem., 31, 793, 1988) の方法で3位の水酸基を選択的にベンジルエーテル化し、 $3-O$ -ベンジル- $5, 6-O$ -イソプロピリデンアスコルビン酸とする。この $3-O$ -ベンジル体をアグリコンとして、通常のグルコシル化反応によって β -配糖体化し、 $2-O-(2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) - $3-O$ -ベンジル- $5, 6-O$ -イソプロピリデンアスコルビン酸を得ることができる。例えば、($2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) 炭酸エステル (小村啓、東京工業大学博士論文、1977年) を $3-O$ -ベンジル体とともに非極性溶媒中で、あるいは無溶媒で $100 \sim 200^\circ\text{C}$ で加熱することによって得ることができる。炭酸エステルとしてはアルキル、ハロゲン化されたアルキル、あるいは置換されてもよいアリール炭酸エステルとして使用することができる。あるいは ($2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) ハライドを用いて、クロロホルムや塩化メチレンなどのハロゲン化炭化水素の溶媒やベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素の溶媒中で水銀塩や銀塩の存在下、脱水剤を添加して反応させることによって得ることもできる (Lodd's Chemistry of Carbon Compounds IF, 320, 1967, Elsvier)。

【0012】

$2-O-(2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ) - $3-O$ -ベンジル- $5, 6-O$ -イソプロピリデンアスコルビン酸のイソプロピリデン基は酸触媒で加水分解して、除去することができる。例えば、 $30\% \sim 80\%$ の酢酸水溶液中、 $40 \sim 100^\circ\text{C}$ で加熱する。あるいはアセトンやメチルエチルケトン中でp-トルエンスルホン酸の存在下、室温から還流温度で加熱する。あるいはそこに水を添加して同様に反応させる

【0013】

$2-O-(2, 3, 4, 6$ -テトラ- O -アセチル- β -D-グルコピラノシリ)

ル) -3-O-ベンジルアスコルビン酸のベンジル基は通常の水素化分解によつて除去できる。例えば、酢酸やアルコールなどのプロトン性極性溶媒中で、あるいはベンゼン、トルエン、酢酸エチルなどの非極性溶媒中で、パラジウム炭素やパラジウム黒、あるいはプラチナ炭素やプラチナ黒などを触媒として水素の存在で脱ベンジル化できる。

これらの脱保護基反応の工程を逆の順に行つてもよい。すなわち、2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル) -3-O-ベンジル-5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸の脱ベンジル化反応の後、得られた2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル) -5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸を酸触媒で脱イソプロピリデン化してもよい。

以上のようにして、表記中間体である2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸を得ることができる。

【0014】

上記中間体を使用して2-O-(β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸を化学合成する方法につき記載する。

2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸のアシル基をアルカリ加水分解することによって、2-O-(β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸を得ることができる。アルカリとしては、苛性ソーダ、苛性カリなどの水溶液、あるいは炭酸カリ、炭酸ソーダ、重炭酸カリ、重炭酸ソーダなどの炭酸塩の水溶液、ナトリウムメチラートなどの金属アルコラートを用いることができる。これらの溶液に、原料の2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸を溶解するために、メタノール、エタノールなどのアルコール類の混合液を用いてもよい。反応温度は0℃～室温が最適である。反応液を塩酸、硫酸あるいはカチオン交換樹脂などで中和する。塩酸や硫酸の場合は生じた塩を除去する必要があるがカチオン交換樹脂の場合はナトリウムやカリウム根を吸着するために脱塩操作は必要ではない。中和された反応液を凍結乾燥あるいは減圧濃縮することによって、目的化合物を得ることができる。また、目的に応じて、カラムクロ

マトグラムによって精製することもできる。

【0015】

クコからの抽出によって2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含有抽出物を製造する方法につき記載する。

クコの生果あるいは乾燥果実(クコシ)を直接もしくは粉碎した状態で、熱水または含水エタノールで浸漬し、固液分離によって得た抽出液を減圧濃縮もしくは凍結乾燥、あるいは噴霧乾燥することによってを含有する抽出物を得ることができる。この浸漬時のアルコール濃度は10%から95%、浸漬日数は3から7日が好ましい。クコシ抽出物中の2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含量は0.86から1.2%であるが、以下に述べる方法によってさらに含量を高めた組成物を得ることができる。すなわち、クコシ抽出物を蒸留水に溶かすか、原料に対して5-50倍量、好ましくは8-10倍量で浸漬した溶液を蒸留水で希釈後、ダウケミカル社製造の商品名Dowex 1-X8、ローム&ハース社製造の商品名Amberlite IRA-400などの強塩基性陰イオン交換樹脂に通導して、該物質を吸着させる。充分な水洗浄の後、酢酸を用いた段階溶出もしくは濃度勾配溶出によって該物質を含む画分を得る。該画分を減圧濃縮あるいは凍結乾燥処理による酢酸除去によって、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含量約30-50%の組成物が得られる。

【0016】

酵素法によって2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸含有組成物を製造する方法につき説明する。

市販の酵素剤についての生成を鋭意検討した結果、セルラーゼ「オノズカ」、パンセラーゼBR(ヤクルト薬品工業)、セルロシン(阪急共栄物産)、セルラーゼ(シグマ)、 β グルコシダーゼ(東洋紡) β グルコシダーゼ(ナカライトスク)酵素剤が β グルコシル転移活性を有する事を見出した。本発明に用いられる糖転移酵素は、 β グルコシル基を含む化合物とアスコルビン酸を含む溶液に作用させ、糖転移反応によって2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を合成するものであればよく、起源、種類は限定されないが、収率の点からT

richoderm 属由来のセルラーゼ剤、アーモンド由来の β グルコシダーゼ剤が好ましい。

【0017】

転移酵素反応については、セロビオースおよびアスコルビン酸濃度はできる限り高い方が望ましいが、0.3Mおよび0.2M程度が好ましい。酵素の基質となるセロビオースは他の β グルコシル基を含む化合物、例えばセルロース、カルボキシメチルセルロース等の高分子グルカンからも適当な加水分解酵素と組み合わせる事により使用する事が可能である。また各酵素を固定化して酵素リアクターとすれば効率的に2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の生産が可能である。一方、転移反応の受容体となるアスコルビン酸は、反応中の安定性、転移収率の点から遊離のアスコルビン酸が好ましいが、アスコルビン酸のアルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などのアスコルビン酸塩、または、それらの混合物でも生産が可能である。またイソアスコルビン酸フリート体およびイソアスコルビン酸塩も同様に転移反応の受容体となる事を見出した。従って、糖転移反応に用いるアスコルビン酸およびアスコルビン酸誘導体は目的に応じて用いる事ができるが、通常、遊離のアスコルビン酸だけでなく、必要に応じて、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カルシウムなどが適宜用いられる。

【0018】

酵素反応はpH 2~8の範囲で進行するが、酵素の至適pHを勘案し、pH 4~6に保つのが好ましい。また反応温度としては20~60℃で進行するが、酵素の安定性および至適温度を勘案して、30~40℃程度に保つ事が望ましい。また酵素添加量は、セロビオース1gあたり20~400単位(1単位とは1分間に1μmolのp-ニトロフェノールを遊離する酵素力価を示す)とするのが望ましい。酵素は、一度に添加しても良いが、高速液体クロマトグラフィー等で反応をモニターしながら、数回に分けて添加することも出来る。また適当な樹脂担体、例えばイオン交換樹脂、疎水樹脂等に酵素を固定化して酵素リアクターとして反応することもできる。反応時間は1~4日間程度で充分であるが、反応をモニターしながら反応終了時点を決定することもできる。

【0019】

反応終了後生成するアスコルビン酸誘導体は、膜分離、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー等、通常の分離手段で分離することができる。例えば、強酸性カチオン交換樹脂はスルホン酸基を結合したステレンジビニルベンゼン架橋共重合体樹脂のアルカリ金属塩型、アルカリ土類金属塩型、またはH+型などが適宜使用され得る。市販品としては、ダウケミカル社製造の商品名ダウエックス 50W×8、ローム&ハース社製造の商品名アンバーライト CG-120、三菱化学社製造の商品名ダイヤイオン SK104などがある。この際に、分離される未反応のアスコルビン酸とβグルコシル基を含む化合物を、再度酵素反応の原料として利用することも可能である。

【0020】

さらに、高純度品を得るために、高速液体クロマトグラフィーによって精製することができる。すなわち、糖・有機酸分析用カラムと酢酸、トリフルオロ酢酸など揮発性の酸との組み合わせ、あるいはODSカラムと昇華性のギ酸アンモニウム、酸性物質分析用の揮発性イオンペナー試薬、D i - n - b u t y l a m i n e Acetateとの組み合わせによって純粋な該物質を得ることができる。天然物の該物質であるとの同定は、化学的な合成による2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の質量分析や核磁気共鳴スペクトルとの比較解析によって行われた。

【0021】

本発明のアスコルビン酸誘導体には、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸である遊離酸のみならず、その人体に安全な塩若しくはエステルを含む。塩としては、具体的には、例えはナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられ、エステルとしては、例えは酢酸エステル、プロピオン酸エステルなどが挙げられる。塩又はエステルは、それぞれ遊離酸に塩基（例えは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム）を反応させる方法又はアシル化反応により行なわれ、これらはいずれも当業者に周知の反応である。

【0022】

次に本発明のアスコルビン酸誘導体の生理活性につき説明する。
2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸による、紫外線照射によ

る障害の抑制

上記方法に従って得られた、あるいは化学的な合成によって得られた純粋な2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は紫外線B波(UV B)照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞(HaCaT)の細胞死をアスコルビン酸や2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸に比較して、同じ濃度で明らかに強く抑制した。

【0023】

無毛マウスの皮膚の一部に太陽光の波長スペクトルに近い光(290~400nm)を照射した場合に、マウス皮膚に含まれる各種の抗酸化因子のうちアスコルビン酸(ビタミンC)が最も急減することが知られている(Photodermatol Photoimmunol Photomed.、10(5)、183、1994)。また、モルモット背部を剃毛後、UV B照射による皮膚炎症の惹起をアスコルビン酸や2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の外用塗布によって抑制され、その効果は2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の方が高い(フレグランスジャーナル、25巻、3月号、55ページ、1997年)。さらに、10%アスコルビン酸水溶液をブタ皮膚に3日から1週間連日前投与することにより、紫外線障害を軽減できることも報告されている(Br. J. Dermatol.、121、247、1992)。

【0024】

従って、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は紫外線照射による皮膚炎症やその他の紫外線障害の抑制に対して、アスコルビン酸や2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸よりも効果が高いことが強く示唆される。

また、ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸の濃度についても2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は最も長く、また高濃度に維持される。このような2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸による細胞内アスコルビン酸の高濃度維持がUV B照射による細胞保護に作用している。また、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸が細胞内で勿論、アスコルビン酸に変換されるプロビタミンCとして働いていることは明白である。

【0025】**2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸による、しわ・たるみの予防**

さらに、ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞（N H D F）のコラーゲン合成に関しても、2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸は2-O-(α-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸やアスコルビン酸に比べて活性が高い。これも、細胞内アスコルビン酸の濃度が持続的に高く維持されているためと考えられる。すなわち、アスコルビン酸のコラーゲン合成促進作用は皮膚由来の線維芽細胞でも起こっており、皮膚の再生や再構築に働いていると考えられる。実際に、熱傷患者に安定型アスコルビン酸の1つであるアスコルビン酸2-リン酸を塗布することによって、瘢痕なく治癒したことが報告されている（日本香粧品学会講演要旨 50ページ、1998年）。一方、アスコルビン酸がコラーゲンを分解する酵素や皮膚の弹性に必要なエラスチンを分解する酵素を抑制することも知られている（バイオ抗酸化剤プロビタミンC、63ページ、1999年、フレグランスジャーナル社）。これらの事実は2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸がしわやたるみを予防する効果があることを示している。

【0026】**2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸の活性による、美白効果**

また、アスコルビン酸がチロシナーゼを阻害してメラニン合成を抑制することや2-O-(α-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸を配合したクリームをヒトに塗布した時、紫外線照射による色素沈着を抑制すること（フレグランスジャーナル、25巻、3月号、55ページ、1997年）から、2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸も同様に、しかし2-O-(α-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸よりも強い美白効果があることが強く示唆される。

【0027】**2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸の経口摂取時の動態**

また、2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸をラットに経口摂取させた場合、血中に未変化体である2-O-(β-D-グルコピラノシル)

アスコルビン酸が検出され、腸管から未変化体として吸収されることを示している。一方、前述したように2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はラットに経口摂取させた場合、血中には未変化体として検出されず、吸収の際、腸管でほとんど分解され、アスコルビン酸として血中に存在する (J. Pharmacobio-Dyn., 13, 688, 1990)。すなわち、経口摂取した場合、2-O-(α -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸はアスコルビン酸として吸収され、血中で速やかに分解される可能性がある。一方、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸は血中に未変化体としても存在し、未変化体のまま組織に移行し、組織あるいは細胞内でアスコルビン酸に活性化される可能性が高い。

【0028】

以上の実験結果および関連知見から、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸およびそれを含有する組成物は優れたプロビタミンCとして、皮膚の保護や健全な皮膚の維持に有用であることが明白であり、皮膚化粧料や皮膚保護剤として使うことができ、また食品として、アスコルビン酸を効率よく、体内および組織に移行させるプロビタミンCとして使うことができる。

【0029】

本発明で使用される麹菌は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する菌であればそれでよく、このような菌としては、例えば黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*)、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) 又は黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) に属する菌、それらに属する菌株並びにそれらの変異株などが挙げられる。麹菌は生菌であってもよいし、死菌であってもよいが、生菌が好ましい。麹菌は、酵素が失活していない限りどのようなものであってもよい。麹菌は、麹菌自体であってもよいが、それを栄養繁殖させた麹菌を含む培養液であってもよいし、麹菌の強いデンプン糖化力をを利用して作製された麹であってもよい。そのような麹として日本酒醸造に使用される麹であってもよい。麹菌の処理物は、麹菌に含有される酵素が失活していない限りどのような処理物であってもよい。麹菌の処理物は、例えば麹菌の乾燥物であってもよい。乾燥は、噴霧乾燥であってもよいし、凍結乾燥であってもよい。麹菌の液体培養液を遠心分離し、その分離上清を凍結乾燥し、水

を加えたものも本発明で使用される麹菌の処理物である。またさらに、麹菌の処理物は、麹菌の抽出物であってもよい。抽出物は、菌体を例えば浸漬、粉碎等の自体公知の手段を用いて処理した菌体の抽出物であってよい。麹菌の菌体をエタノール浸漬滅菌後、遠心分離して得た沈殿部に、ミリQ超純水を5倍量添加して粉碎・抽出し、抽出液を濃縮することによっても麹菌の抽出物が得られる。上記麹菌又はその処理物は、市販品であってもよく、このような市販品としては、例えば、黄麹 (*Aspergillus oryzae*) 由来の酵素製剤（天野エンザイム社製、商品名ビオザイムA）、又は（株）ビオック製米麹用麹菌乾燥粉末等が挙げられる。

【0030】

本発明の組成物につき説明する。化粧品又は医薬部外品として有用な本発明の外用組成物は、皮膚に適用される場合には、2-O-(β -D-グルコピラノシル) アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステル（以下、（イ）成分と略称することもある）と麹菌又はその処理物（以下、（ロ）成分と略称することもある）を含有する。しかしながら、上記（イ）成分と（ロ）成分を混合した状態で長期間保存すると、（イ）成分の分解反応が進行することもあるので、（イ）成分を含有する組成物と（ロ）成分を含有する組成物とを分離した状態で保存し、皮膚適用時に両組成物を皮膚表面に塗布してもよい。従って、本発明は、（イ）成分と（ロ）成分を共に含む組成物のみならず、（イ）成分含有組成物と（ロ）成分含有組成物のセット若しくは組み合わせをも包含する。また、本発明は、（ロ）成分含有組成物の（イ）成分皮膚浸透促進のための使用をも包含する。使用時の本発明の製剤は、（イ）成分と（ロ）成分を含む製剤であってもよいが、（ロ）成分含有組成物に（イ）成分又はそれを含有する組成物を配合することによって作製される製剤であってもよい。本発明の製剤、すなわち、（イ）成分と（ロ）成分を含む製剤、又は（イ）成分含有組成物と（ロ）成分含有組成物のセット又は（イ）成分含有組成物は、通常は外用組成物であって、化粧品であっても、医薬部外品であっても、医薬品であってもよい。化粧品としては、例えば、化粧水、乳液、美容液などの基礎化粧品、ファンデーションなどのメークアップ化粧品、頭髪化粧品、清浄用化粧品、口唇化粧品、口腔化粧品、爪化粧品、アイライナー化粧品、入浴用化粧品、日焼け止め化粧品などが挙げられる。

医薬品または医薬部外品としては、例えば、ドライアイ用点眼剤の他、薬用化粧品、育毛剤などが挙げられる。

【0031】

本発明の好ましい態様につき説明する。

本発明の組成物、すなわち（イ）成分と（ロ）成分を含有する組成物又は（イ）成分を含有する組成物と（ロ）成分を含有する組成物を使用時に混合することによって得られる組成物中の2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の含有量は、特に限定されず広範囲に使用することができるが、組成物の全重量に対して通常0.1～30重量%、好ましくは0.5～10重量%である。組成物中の麹菌又はその処理物は、一概にはいえないが、通常約0.2～100重量%である。

【0032】

本発明の（イ）成分含有組成物には、（イ）成分以外に、通常化粧料に配合される各種の色剤、油性成分、フッ素化合物、樹脂、粘度調整剤、防腐殺菌剤、香料、他の保湿剤、塩類、アルコール類、酸化防止剤、緩衝剤、中和剤、pH調整剤、昆虫忌避剤等の成分を使用することができる。

【0033】

色剤の例としては、通常の化粧料に使用されるものであれば、その形状（球状、棒状、針状、板状、不定形状、鱗片状、紡錘状等）や粒子径（煙霧状、微粒子、顔料級等）、粒子構造（多孔質、無孔質等）を問わず、いずれのものも使用することができ、例えば無機粉体、有機粉体、界面活性剤金属塩粉体、有色顔料、パール顔料、金属粉末顔料、天然色素等があげられ、具体的には、無機粉体としては、顔料級酸化チタン、酸化ジルコニウム、顔料級酸化亜鉛、酸化セリウム、酸化マグネシウム、硫酸バリウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、タルク、マイカ、カオリン、セリサイト、白雲母、合成雲母、金雲母、紅雲母、黒雲母、リチア雲母、ケイ酸、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ケイ酸カルシウム、ケイ酸バリウム、ケイ酸ストロンチウム、タングステン酸金属塩、ヒドロキシアパタイト、バーミキュライト、ハイジライト、ベントナイト、モ

ンモリロナイトや、ヘクトライト、ゼオライト、セラミックスパウダー、第二リン酸カルシウム、アルミナ、水酸化アルミニウム、窒化ホウ素、窒化ボロン、シリカ、微粒子酸化チタン、微粒子酸化亜鉛、微粒子酸化セリウム等；有機粉体としては、ポリアミドパウダー、ポリエステルパウダー、ポリエチレンパウダー、ポリプロピレンパウダー、ポリスチレンパウダー、ポリウレタンパウダー、ベンゾグアナミンパウダー、ポリメチルベンゾグアナミンパウダー、ポリテトラフルオロエチレンパウダー、ポリメチルメタクリレートパウダー、セルロース、シリクパウダー、ナイロンパウダー、12ナイロン、6ナイロン、シリコーンパウダー、シリコーンゴムパウダー、シリコーンエラストマー球状粉体、スチレン・アクリル酸共重合体、ジビニルベンゼン・スチレン共重合体、ビニル樹脂、尿素樹脂、フェノール樹脂、フッ素樹脂、ケイ素樹脂、アクリル樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、ポリカーボネイト樹脂、微結晶纖維粉体、デンプン末、ラウロイルリジン等；界面活性剤金属塩粉体（金属石鹼）としては、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、ミリスチン酸亜鉛、ミリスチン酸マグネシウム、セチルリン酸亜鉛、セチルリン酸カルシウム、セチルリン酸亜鉛ナトリウム等；有色顔料としては、酸化鉄、水酸化鉄、チタン酸鉄の無機赤色顔料、 γ -酸化鉄等の無機褐色系顔料、黄酸化鉄、黄土等の無機黄色系顔料、黒酸化鉄、カーボンブラック等の無機黑色顔料、マンガンバイオレット、コバルトバイオレット等の無機紫色顔料、水酸化クロム、酸化クロム、酸化コバルト、チタン酸コバルト等の無機緑色顔料、紺青、群青等の無機青色系顔料、タール系色素をレーキ化したもの、天然色素をレーキ化したもの、及びこれらの粉体を複合化した合成樹脂粉体等；パール顔料としては、酸化チタン被覆雲母、酸化チタン被覆マイカ、オキシ塩化ビスマス、酸化チタン被覆オキシ塩化ビスマス、酸化チタン被覆タルク、魚鱗箔、酸化チタン被覆着色雲母等；タール色素としては、赤色3号、赤色104号、赤色106号、赤色201号、赤色202号、赤色204号、赤色205号、赤色220号、赤色226号、赤色227号、赤色228号、赤色230号、赤色401号、赤色505号、黄色4号、黄色5号、黄色202号、黄色203号、黄色204号、黄色401号、青色1号、青色2号、青色201号、青色404号、緑色3号、緑色

201号、緑色204号、緑色205号、橙色201号、橙色203号、橙色204号、橙色206号、橙色207号等；天然色素としては、カルミン酸、ラッカイン酸、カルサミン、ブラジリン、クロシン等から選ばれる粉体で、これらの粉体も前記同様に本発明の効果を妨げない範囲で、粉体の複合化や一般油剤、シリコーン油、フッ素化合物、界面活性剤等で処理したものも使用することができる。例えば、フッ素化合物処理、シリコーン樹脂処理、ペンダント処理、シランカップリング剤処理、チタンカップリング剤処理、油剤処理、N-アシル化リジン処理、ポリアクリル酸処理、金属石鹼処理、アミノ酸処理、無機化合物処理、プラズマ処理、メカノケミカル処理などによって事前に表面処理されていてもいなくてもかまわないし、必要に応じて一種、又は二種以上の表面処理を併用することができる。本発明ではこれらの粉体の1種以上を組み合わせて使用することができる。

【0034】

油性成分の例としては、例えばアボガド油、アマニ油、アーモンド油、イボタロウ、エノ油、オリーブ油、カカオ脂、カポックロウ、カヤ油、カルナウバロウ、肝油、キャンデリラロウ、牛脂、牛脚脂、牛骨脂、硬化牛脂、キョウニン油、鯨ロウ、硬化油、小麦胚芽油、ゴマ油、コメ胚芽油、コメヌカ油、サトウキビロウ、サザンカ油、サフラワー油、シアバター、シナギリ油、シナモン油、ジョジョバロウ、セラックロウ、タートル油、大豆油、茶実油、ツバキ油、月見草油、トウモロコシ油、豚脂、ナタネ油、日本キリ油、ヌカラウ、胚芽油、馬脂、パーシック油、パーム油、パーム核油、ヒマシ油、硬化ヒマシ油、ヒマシ油脂肪酸メチルエステル、ヒマワリ油、ブドウ油、ベイベリーロウ、ホホバ油、マカデミアナッツ油、ミツロウ、ミンク油、綿実油、綿ロウ、モクロウ、モクロウ核油、モンタンロウ、ヤシ油、硬化ヤシ油、トリヤシ油脂肪酸グリセライド、羊脂、落花生油、ラノリン、液状ラノリン、還元ラノリン、ラノリンアルコール、硬質ラノリン、酢酸ラノリン、ラノリン脂肪酸イソプロピル、ラウリン酸ヘキシル、P O Eラノリンアルコールエーテル、P O Eラノリンアルコールアセテート、ラノリン脂肪酸ポリエチレングリコール、P O E水素添加ラノリンアルコールエーテル、卵黄油等；炭化水素油として、オゾケライト、スクワラン、スクワレン、セレ

シン、パラフィン、パラフィンワックス、流動パラフィン、プリスタン、ポリイソブチレン、マイクロクリスタリンワックス、ワセリン等；高級脂肪酸としては、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）、イソステアリン酸、12-ヒドロキシステアリン酸等；高級アルコールとしては、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、パルミチルアルコール、ステアリルアルコール、ベヘニルアルコール、ヘキサデシルアルコール、オレイルアルコール、イソステアリルアルコール、ヘキシルドデカノール、オクチルドデカノール、セトステアリルアルコール、2-デシルテトラデシノール、コレステロール、フィトステロール、P O Eコレステロールエーテル、モノステアリルグリセリンエーテル（バチルアルコール）、モノオレイルグリセリルエーテル（セラキルアルコール）等；エステル油としては、アジピン酸ジイソブチル、アジピン酸2-ヘキシルデシル、アジピン酸ジ-2-ヘプチルウンデシル、モノイソステアリン酸N-アルキルグリコール、イソステアリン酸イソセチル、トリイソステアリン酸トリメチロールプロパン、ジ-2-エチルヘキサン酸エチレングリコール、2-エチルヘキサン酸セチル、トリ-2-エチルヘキサン酸トリメチロールプロパン、テトラ-2-エチルヘキサン酸ペンタエリスリトール、オクタン酸セチル、オクチルドデシルガムエステル、オレイン酸オレイル、オレイン酸オクチルドデシル、オレイン酸デシル、ジカプリン酸ネオペンチルグリコール、クエン酸トリエチル、コハク酸2-エチルヘキシル、酢酸アミル、酢酸エチル、酢酸ブチル、ステアリン酸イソセチル、ステアリン酸ブチル、セバシン酸ジイソプロピル、セバシン酸ジ-2-エチルヘキシル、乳酸セチル、乳酸ミリスチル、パルミチン酸イソプロピル、パルミチン酸2-エチルヘキシル、パルミチン酸2-ヘキシルデシル、パルミチン酸2-ヘプチルウンデシル、12-ヒドロキシステアリル酸コレステリル、ジペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸2-ヘキシルデシル、ミリスチン酸ミリスチル、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシル、ラウリン酸エチル、ラウリン酸ヘキシル、N-ラウロイル-L-グルタミン酸-2-オクチルドデシルエステル、リンゴ酸

ジイソステアリル等；グリセライド油としては、アセトグリセリル、トリイソオクタン酸グリセリル、トリイソステアリン酸グリセリル、トリイソパルミチン酸グリセリル、モノステアリン酸グリセリル、ジ-2-ヘプチルウンデカン酸グリセリル、トリミリスチン酸グリセリル、ミリスチン酸イソステアリン酸ジグリセリル等が挙げられる。

【0035】

防腐剤としては、パラオキシ安息香酸アルキルエステル、安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、フェノキシエタノール等、殺菌剤としては、安息香酸、サリチル酸、石炭酸、ソルビン酸、パラオキシ安息香酸アルキルエステル、パラクロルメタクレゾール、ヘキサクロロフェン、塩化ベンザルコニウム、塩化クロルヘキシジン、トリクロロカルバニリド、トリクロサン、感光素、フェノキシエタノール等がある。

【0036】

また、保湿剤としては、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン、ジグリセリン、ソルビトール、マルビトール、トレハロース、ラフィノース、キシリトール、マンニトール、ポリエチレングリコール、ポリグリセリン等のグリコール類などの多価アルコール類および多糖類等が挙げられる。これらは単独でまたは2種以上を混合して本発明に用いることが好ましい。

【0037】

粘度調整剤の例としては、アラビアゴム、トラガカント、アラビノガラクタン、ローカストビーンガム（キャロブガム）、グーガム、カラヤガム、カラギーナン、ペクチン、寒天、クインスシード（マルメロ）、デンプン（コメ、トウモロコシ、バレイショ、コムギ）、アルゲコロイド、トラントガム、ローカストビーンガム等の植物系高分子、キサンタンガム、デキストラン、サクシノグルカン、プルラン等の微生物系高分子、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、ゼラチン等の動物系高分子、カルボキシメチルデンプン、メチルヒドロキシプロピルデンプン等のデンプン系高分子、メチルセルロース、エチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセ

ルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ニトロセルロース、セルロース硫酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、セルロース末のセルロース系高分子、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル等のアルギン酸系高分子、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー等のビニル系高分子、ポリエチレングリコール等のポリオキシエチレン系高分子、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合体系高分子、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリエチルアクリレート、ポリアクリル酸アミド等のアクリル系高分子、ポリエチレンイミン、カチオンポリマー、ベントナイト、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ラポナイト、スマクタイト、サポナイト、ヘクトライト、無水ケイ酸等の無機系増粘剤などが挙げられる。また、他の増粘剤として、油溶性ゲル化剤があり、例えば、アルミニウムステアレート、マグネシウムステアレート、ジンクミリステート等の金属セッケン、N-ラウロイル-L-グルタミン酸、 α , γ -ジ- n -ブチルアミン等のアミノ酸誘導体、デキストリンパルミチン酸エステル、デキストリンステアリン酸エステル、デキストリン2-エチルヘキサン酸パルミチン酸エステル等のデキストリン脂肪酸エステル、ショ糖パルミチン酸エステル、ショ糖ステアリン酸エステル等のショ糖脂肪酸エステル、モノベンジリデンソルビトール、ジベンジリデンソルビトール等のソルビトールのベンジリデン誘導体、ジメチルベンジルドデシルアンモニウムモンモリロナイトクレー、ジメチルジオクタデシルアンモニウムモンモリナイト、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムモンモリナイト等の有機変性粘土鉱物等が挙げられる。

この（イ）成分含有組成物はそれ単独で外用組成物としてだけでなく、上記成分を混合することによって、化粧品、医薬部外品としてのローション、乳液、クリーム、パック剤、石鹼等の薬用化粧料、又は医薬品としてのローション、乳液、クリーム、軟膏等の皮膚外用剤としても使用することもできる。

【0038】

（ロ）成分含有組成物は、麹菌又はその処理物のみであってもよいし、他の例えば水、アルコール等の液体希釈剤又は例えばパラフィン等の固体希釈剤又は例えば流動パラフィン等の半固体希釈剤で希釈されていてもよい。或いは上記した

(イ) 成分含有組成物において、(イ) 成分のかわりに(ロ) 成分を使用した組成物を(ロ) 成分含有組成物として用いてもよい。

【0039】

(イ) 成分と(ロ) 成分を含有する組成物は、(イ) 成分と(ロ) 成分と上記(イ) 成分含有組成物で説明した各種成分とを混合することによって製造され、上記した(イ) 成分含有組成物と(ロ) 成分含有組成物とを混合することによって得られる組成物であってもよい。

皮膚外用剤として皮膚表面に適用する場合、(イ) 成分含有組成物と(ロ) 成分含有組成物とを混合する。混合後、混合物を皮膚表面に適用する。両組成物を混合するに際して、(イ) 成分と(ロ) 成分の使用割合は、重量比率で約1:0.001~0.1、好ましくは約1:0.005~0.05である。

(イ) 成分含有組成物と(ロ) 成分含有組成物との混合は、よく知られた方法により行われてよい。

本発明の組成物が化粧品である場合の好ましい態様を説明する。上記化粧品が化粧水である場合には、(イ) 成分含有組成物と(ロ) 成分含有組成物とを溶媒に溶解又は分散させることにより上記化粧水が得られる。

上記化粧品が乳液である場合には、(イ) 成分含有組成物と(ロ) 成分含有組成物とを、例えばホモジナイザー等を用いて上記(イ) 成分及び(ロ) 成分を除いた原料を乳化させた混合液に配合することにより上記乳液が得られる。

このようにして作製される使用時の本発明の組成物は、例えば、化粧水、乳液、美容液などの基礎化粧品、ファンデーションなどのメークアップ化粧品、頭髪化粧品、清浄用化粧品、口唇化粧品、口腔化粧品、爪化粧品、アイライナー化粧品、入浴用化粧品、日焼け・日焼け止め化粧品などに用いられる。医薬品または医薬部外品にも用いられ、このような例としては、ドライアイ用点眼剤の他、薬用化粧品、育毛剤などが挙げられる。

【0040】

【実施例】

以下、実施例に基づいて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲をこれらの実施例に限定するものではないことは言うまでもない。

【0041】

(実施例1)

2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシリル) アスコルビン酸の合成：

5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸(2 g、9.3 mmol)をDMSO(20 ml)に溶解し、炭酸カリ(1.3 g、9.4 mmol)および臭化ベンジル(1.1 ml、9.3 mmol)を加え、50°Cで4時間攪拌した。反応液に水を加え、1N-HClで酸性にした後、酢酸エチルで抽出、水洗、飽和食塩水で洗浄後、無水MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルクロマト(AcOEt/n-Hexane = 3:1)で精製し、1.1 gの3-O-ベンジル-5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸を得た(収率：39%)。

このベンジル誘導体(0.6 g、2.0 mmol)および2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-1-O-(2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル)- β -D-グルコピラノース(2.1 g、4.0 mmol)の混合物を120-130°Cで加熱溶融した。3時間反応後、反応液をカラムクロマト(25%AcOEt/n-Hexaneから50%までのグラジエント)で精製し、2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシリル)-3-O-ベンジル-5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸850 mgを得た(収率：67%)。

上記配糖体(850 mg、1.3 mmol)を酢酸エチル(40 ml)に溶解し、10%Pd-C(200 mg)を加え、水素化分解した。2時間後、触媒をろ去し、濃縮して、約750 mgの2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシリル)-5, 6-O-イソプロピリデンアスコルビン酸を得た。

この脱ベンジル体(500 mg、0.9 mmol)を酢酸(5 ml)に溶解し、水(5 ml)を加え、50-60°Cで1.5時間加熱攪拌した。反応液を濃縮後、水洗、飽和食塩水で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチル-ヘキサンから結晶化し、320 mgの2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸を

得た（収率：48%）。PMR (δ ppm、DMSO-d₆)；1.94-2.01 (12H), 3.42 (3H, m), 3.7-4.3 (4H, m), 4.7-5.1 (4H, m), 5.3-5.4 (2H, m), 7.2.00 (1H, b r)。FABMS (+) m/z : 507。

【0042】

（実施例2）

2-O- β -D-グルコピラノシリルアスコルビン酸の合成：

2-O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸 (300mg、0.6mmol) をメタノール (10ml) に溶解し、炭酸カリ (600mg) を水 (9ml) に溶解した溶液を添加し、30分間攪拌した。反応液をIR-120 (H⁺) で中和し、樹脂をろ去し、さらにメタノールおよび50%メタノール水溶液で洗浄した。ろ液と洗浄液を合わせ、濃縮後、水を加え、凍結乾燥し、アモルファスな結晶 (190mg、収率：100%) の2-O- β -D-グルコピラノシリルアスコルビン酸を得た。PMR (δ ppm、D₂O)；3.1-3.3 (4H, m), 3.4-3.5 (3H, m), 3.58 (1H d), 3.80 (1H, t), 4.61 (1H, d), 4.66 (1H, d)。FABMS (-) m/z : 337。

【0043】

（実施例3）

クコ中の2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸の含量測定

2-O-(β -D-グルコピラノシリル)アスコルビン酸の化学合成品の高速液体クロマトグラフィー（島津製作所（株）製 LC-10A i システム、カラム：Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス（株）製、4.6X150 mm、5μm）、移動相：20% MeOH-20mM リン酸-5mM 臭化テトラ-n-アミルアンモニウム、流速：1.0mL/分、カラム温度：35℃、検出波長：254nm）における保持時間2.63分を指標に、乾燥植物3gに対して10倍量の70%エタノールにて室温7日間浸漬することによって得た抽出液を1.5%メタリン酸/5M KOH (pH 3.5) にて10倍

希釈し、これを被検試料として、天然に存在する 2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸を検索した。その結果、寧夏産および河北産クコシの抽出液中に、2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸に相当するピークの存在を認めた。また、寧夏産クコの生果 100 g に対して 2 倍量の 70 % エタノールを加え、同様に処理した試料にも同じように、その存在を認めた。一方抽出固体分は、上記抽出液の一部、5 mL を減圧濃縮後の凍結乾燥重量測定によって求めた。抽出固体分、化学合成品を用いた検量線、抽出液中の濃度、および希釈倍率を併せ考慮したところ、抽出物あたりの含量は 0.86 から 1.2 % であった。

【0044】

(実施例 4)

クコシに含まれる 2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸の精製
寧夏産クコシ 100 g を(株)トーショー製錠剤粉碎器 TS-10M 型にて砕き、30 % エタノール 800 mL を添加して、室温下 6 日間浸漬し、ろ過後、減圧濃縮、凍結乾燥により 65.7 g を得た。この抽出物の一部 1.94 g (2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸含量 0.86 %) を蒸留水にて溶解させ、40 mL とした (pH 4.5、電導度 1.7 mS/cm)。この試料を Dowex 1-X8 カラム (酢酸型、1.5 X 12 cm) に SV=1 にて通導した。通導後、約 10 カラム体積 (200 mL) の蒸留水による洗浄、0-0.1 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (100 mL X 2)、そして 0.1-1.0 M 酢酸の直線濃度勾配溶出 (100 mL X 2)、さらに 1.0 M 酢酸による溶出を行った。280 nm における吸光度を測定するとともに、2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸の溶出を化学合成品の保持時間を対照に、高速液体クロマトグラフィーによって調べた。装置、カラム温度は実施例 1 に同じだが、他の条件を、カラム: Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス(株) 製、3.0 X 150 mm、5 μ m)、流速: 0.3 mL/min、検出波長: 245 nm、移動相: 2 % MeOH - 0.2 M KH₂PO₄ / H₃PO₄ (pH 3.0) - 0.2 mM EDTA - 0.5 mM 塩化ドデシルトリメチルアンモニウムに変更したところ、化学合成品 2-O-(β -

D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸の保持時間は6. 5分であった。高速液体クロマトグラフィーによる検討の結果、カラムに吸着した該物質は0. 1-1. 0M酢酸直線濃度勾配溶出の画分19-25に溶出した(26mg、画分19-25の総回収率78%、純度50%)。

【0045】

(実施例5)

2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸の酵素合成

2-O-(β -D-グルコピラノシリ) アスコルビン酸の化学合成品のGILSON社製 LCシステム(マスターポンプ305型、UV検出器116型)、カラム: Inertsil ODS-3(ジーエルサイエンス(株)製、4.6X150mm、5μm)、移動相: 20% MeOH-20mM リン酸-5mM 臭化テトラ-n-アミルアンモニウム、流速: 0. 5ml/分、検出波長: 254 nm)における保持時間5. 2分を指標に、市販のセルラーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -グルカナーゼ酵素剤について検索した。なお、酵素反応系はセロビオース0. 3Mおよびアスコルビン酸0. 2Mとなるように10mM酢酸緩衝液(pH5. 0)で溶解して1mlとした。これに酵素液を50μl添加して37℃で反応を開始した。100℃、5分間加熱して反応停止した後、高速液体クロマトグラフィーで生成した β -D-グルコピラノシリーアスコルビン酸を分析した。その結果、セルラーゼ(シグマ社製)、 β -グルコシダーゼ(東洋紡、ナカライトスク)、セルロシンT2(阪急共栄物産)、セルラーゼ「オノズカ」RS、「オノズカ」FAおよびパンセラーゼBR(ヤクルト薬品工業)に β グルコシリ転移活性を有する事を見出した。遊離のアスコルビン酸が4. 0分の位置に現れたのに対し、この前後の3. 6分と5. 2分の位置にピークが認められ、それぞれ物質X、物質Yとした。なお、物質Xの転移率は15. 7%、物質Yの転移率は0. 8%を示した。この物質Xと物質Yは化学合成品とのクロマト分析より、物質Xは6-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸、物質Yは2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸と保持時間が一致した。

さらに、分子量1万カットのUF膜にて共存するタンパク質を除去した後、遊

離のアスコルビン酸を除去するため、高速液体クロマトグラフィー (GILSON 社製 LC システム (マスターポンプ 305 型、UV 検出器 116 型) 、カラム: SUGAR SH1011 (昭和電工(株) 製) 、移動相: 0.1M 酢酸、流速: 0.5 mL/分、カラム温度: 30°C、検出: 示差屈折計、0.25 mL 分画) を用いて分取した。物質 X と物質 Y を含む画分は 29-31 に溶出され、収率 96% で 24.7 μg の標品を得た。

さらに、高速液体クロマトグラフィーに供することによって高純度品を得た。条件は、 GILSON 社製 LC システム (マスターポンプ 305 型、UV 検出器 116 型) 、カラム: ODS-UG-5 (野村化学(株) 製、4.6 × 250 mm、5 μm) 、移動相: 5% メタノール - 20 mM ギ酸アンモニウム - 5 mM Di-n-butylamine Acetate、流速: 0.5 mL/分、検出波長: 254 nm で、0.5 分ずつ、フラクションコレクター FC-203B 型 (GILSON 社製) を用いて分取した。物質 X と物質 Y に相当する画分を減圧濃縮、凍結乾燥後、重水に溶解させ、核磁気共鳴スペクトルを測定することにより、化学合成品 2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸と比較した。HSQC スペクトルにおいて、化学合成品のアスコルビン酸部分構造中 4 位、5 位、6 位炭素の化学シフトはそれぞれ 73、73、66 ppm であるのに対して、物質 X では 4 位、5 位、6 位炭素の化学シフトはいずれも 73 ppm と、6 位に相当する炭素のみ低磁場シフトしていることから、物質 X は 6-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸である。

物質 Y は化学合成品 2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸との一次元 PMR スペクトル比較で一致したことから 2-O-(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸である。

【0046】

(実施例 6)

(β-D-グルコピラノシル) アスコルビン酸の精製

セルラーゼ剤 (Sigma) 20 mg を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 mL に溶解し、同緩衝液で平衡化した Marathon WBA (樹脂 0.5 mL、ダウケミカル社製) に供して素通り画分を得た。この酵素液を、アスコルビ

ン酸0.35gとセロビオース1gを溶解した20mM酢酸緩衝液(pH5.0)10mlに添加して37℃で2日間反応させた結果、6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸11.8%、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸0.8%の反応液を得た。本溶液をUF膜で濾過して酵素を回収除去した液(pH4.3、電導度1.6mS/cm)をDowex 1-X8カラム(酢酸型、1.5X12cm)にSV=2.5にて通導した。通導後、約10カラム体積(200mL)の蒸留水による洗浄、0-0.1M酢酸の直線濃度勾配溶出(80mLX2)、そして0.1-1.0M酢酸の直線濃度勾配溶出(80mLX2)を行った。6-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有画分(フラクション65-68)、未反応アスコルビン酸高含有画分、2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有画分(フラクション101-108)の順に分画された。このフラクション101-108画分を2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸高含有画分として採取した(2.4mg、回収率45%)。

【0047】

(実施例7)

紫外線B波(UVB)照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞(HaCAT)の細胞死に対する2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸の保護効果：

ヒト皮膚角化細胞HaCAT(ハイデルベルグ大学Fusenig博士から恵与された細胞株)を10%ウシ胎仔血清(FBS)含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で24ウェルプレートに10000細胞/ウェルを蒔いて18時間後に35ミリジュール/平方センチメートル(mJ/cm²)のUVB(極大波長312nm)を照射する。照射前2時間に2-O-(β -D-グルコピラノシル)アスコルビン酸を20-100μM添加しておき、照射直前に除去しリソスする。照射は薬剤非存在下PBS中で行ない、照射後はFBS10%含有DMEM培地で培養を継続し、照射後24時間に細胞生存率を2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスホフェニル)-2H-テトラゾリウム、一ナトリウム塩(WST-1)を用いたミトコンドリア

脱水素酵素活性測定法で調べた。結果を図1に示す。同様に、比較例として、2-O-(α -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図1に示した。

【0048】

(実施例8)

ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸の濃度に対する2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の効果：

ヒト皮膚角化細胞HaCaT細胞を100ミリメートル 直径のディッシュに370000細胞蒔く。培養16時間後に、HaCaTの24時間無血清培養液を40%添加した10%FBS含有DMEM培地に溶かした2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸を100 μ M加える。添加後3-24時間に培地を除去して、氷冷したPBSで2回リシスし、トリプシンで細胞シートを剥離し、単一細胞の状態とする。これを50 μ Mのジチオスレイトール(DTT)を含有したPBSで懸濁し、遠心処理によって3回リシスする。細胞懸濁液をポッターモデルカット(日本ミリポア(株)製、加圧式限外ろ過ユニット、分画分子量 10000、ポリエーテルスルホン膜)処理して高速液体クロマトグラフィー(東ソー(株)製 AS-8020システム、カラム：Shodex ODS pak(昭和電工(株)製、4.6X150 mm)、移動相：0.1M KH₂PO₄-H₃PO₄(pH 2.35)-0.1mMEDTA-2Na、流速：1.5 mL/分)で細胞内アスコルビン酸量をクーロメトリック電気化学検出器(ESA Co, Bedford, MA, 200 mV)で分析する。結果を図2に示す。同様に、比較例として、2-O-(α -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図2に示した。

【0049】

(実施例9)

ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞(NHDF)のコラーゲン合成に関する2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の促進効果：

ヒト皮膚纖維芽細胞N H D F を 1 0 0 ミリメートル 直径のディッシュに 3 7 0 0 0 0 細胞蒔く。1 6 時間後に、N H D F の 2 4 時間無血清培養液を 4 0 % 添加した 1 0 % F B S 含有 D M E M 培地中に、2 - O - (β - D - グルコピラノシル) アスコルビン酸を 1 0 0 μ M 加える。さらに 1 時間後に L - [2 , 3 - 3 H] プロリンを 0. 1 2 mL (1 2 0 μ C i) 添加して、4 8 時間培養する。培養後に培地を除去し、細胞シートを P B S で 4 回リーンスする。次いで細胞をトリプシン剥離し、アルカリで細胞溶解した後、中和して細胞内蛋白質を得る。これを C l o s t r i d i u m のコラゲナーゼでコラーゲン分解して得られた蛋白質画分を、シンチゾール E X - H を用いた液体シンチレーションカウンタで放射活性として測定する。また、コラーゲナーゼで処理しない細胞内蛋白質画分を、同じく液体シンチレーションカウンタで放射活性として測定する。それぞれの放射活性の差を求めて、コラーゲン合成活性とする。結果を図 3 に示す。同様に、比較例として、2 - O - (α - D - グルコピラノシル) アスコルビン酸、アスコルビン酸も検討し、同じく図 3 に示した。

【0050】

(実施例 10)

インフォームドコンセントの得られたヒト摘出皮膚片（51才の女性の耳后下皮膚）を垂直方向に短冊型小片に分割し、この小片を改変プロノフ拡散セルチャンバーに組み込んだ。皮下側を D M E M 培地（2 mL）に漬けて栄養を供給しつつ、角質層側へは 5 % C O ₂ を通気して培地の p H を 7. 2 5 に維持した。角質層の上に、2 - O - β - D - グルコピラノシル) アスコルビン酸（以下 A β G とも略称する）1 0 0 mM { 3. 3 8 % w/w 、 P B S (-) 溶液（塩化カルシウム、塩化マグネシウムの金属塩類を含まない、リン酸緩衝化生理食塩水（Phosphate Buffered Saline））} 1 mL を染み込ませた約 5 mm 四方の二重ガーゼをあてると同時に、黄麹 (Aspergillus oryzae) 由来の酵素製剤（天野エンザイム社製、商品名ビオザイム A) の 2 5 w/w % P B S (-) 溶液をろ過滅菌後、1 小片あたり 1 / 2 0 0 (5 μ L) 、 1 / 5 0 0 (2 μ L) 、 1 / 1 0 0 0 液量 (1 μ L) をガーゼ上に添加した（以下、B z とも略称する）。

また、上記方法において、（株）ビオック製米麹用麹菌乾燥粉末 1 g に 5 mL

のミリQ超純水を添加した懸濁液に、凍結融解とポッター型テフロンホモジエナイザーによる破碎を施し、遠心分離して得られる上清をろ過滅菌して、1/20 (50 μL)、1/50 液量 (20 μL) をBzの代わりにガーゼ上に添加した（以下、Kjとも略称する）。また、上記方法において、BzやKjの添加物を用いず、AβGのみを投与することも行った。

投与5時間後に改変プロノフ拡散セルから皮膚小片を切り出し、0.1%トリプシンのPBS（-）溶液を10倍量添加して、37℃、3時間処理後、温かに搅拌して、表皮と真皮に分離した。無気泡下で、ポッター型テフロンホモジエナイザーと液体窒素での凍結融解をそれぞれに施し、細胞破碎した。破碎液の遠心分離上清を限外ろ過したのち、AβGをUV法にて、また、総ビタミンC（還元型と酸化型の総和）および還元型ビタミンC量を電気化学的検出法により、実施例8と同様の方法にて測定した。この際、総ビタミンC量に占める割合を求めた。ヒト摘出皮膚片に、AβG単独或いは添加物を同時投与した5時間後の表皮及び真皮中の総ビタミンC量を表1に示す。ヒト摘出皮膚片に、AβG単独或いは添加物を同時投与した5時間後の表皮及び真皮中の還元型ビタミンCの総ビタミンC量に占める割合を表2に示す。ヒト摘出皮膚片に、AβG単独或いは添加物を同時投与した5時間後の表皮及び真皮へのAβG取り込み量を表3に示す。

【表1】

AβG 投与量	酵素	添加量	皮膚中の総ビタミンC (nmol/g 組織)	
			表皮	真皮
100 mM	なし	なし	15	3
100 mM	Bz	1/200	162	11
		1/500	57	7
100 mM	Kj	1/20	15	6
		1/50	18	8

【0051】

【表2】

A _β G 投与量	酵素	添加量	皮膚中の還元型ビタミンCの総ビタミンCに占める割合(%)	
			表皮	真皮
100 mM	なし	なし	67	25
100 mM	Bz	1/200	82	60
		1/500	77	42
100 mM	Kj	1/20	77	40
		1/50	77	37

【0052】

【表3】

A _β G 投与量	酵素	添加量	皮膚片へのA _β G取り込み量 (nmol/g組織)	
			表皮	真皮
100mM	なし	なし	3,400	500
100 mM	Bz	1/200	8,600	250
		1/500	6,700	250
		1/1000	3,200	1,300
100 mM	Kj	1/20	2,300	960
		1/50	2,600	1,600

表1に示すように、B_gやB_zの同時添加によって、皮膚組織中で特にビタミンCの供給が困難な皮膚表面から0.1から1.3mmの深さにある真皮にもビタミンCエンリッチメントが達成された。このビタミンCエンリッチメントという一次効果が、真皮繊維芽細胞におけるコラーゲン合成促進を介したシワ防御効果という二次効果につながる。また、表3に示すように、B_zやK_jの同時添加

によって、プロビタミンCであるA_βGの皮膚表面から深部への浸透移行性が増した。

以上の結果から、本発明の2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸は、麹菌又はその処理物の存在により皮膚浸透性が著しく改善され、ビタミンCへの変換も良好であることが分かる。

【0053】

【発明の効果】

本発明によって、安定性に優れ、生体内で持続的に利用され、抗酸化作用が強く、皮膚刺激性が少ないアスコルビン酸誘導体を含み、皮膚浸透性が優れた皮膚外用組成物を提供できる。

【図面の簡単な説明】

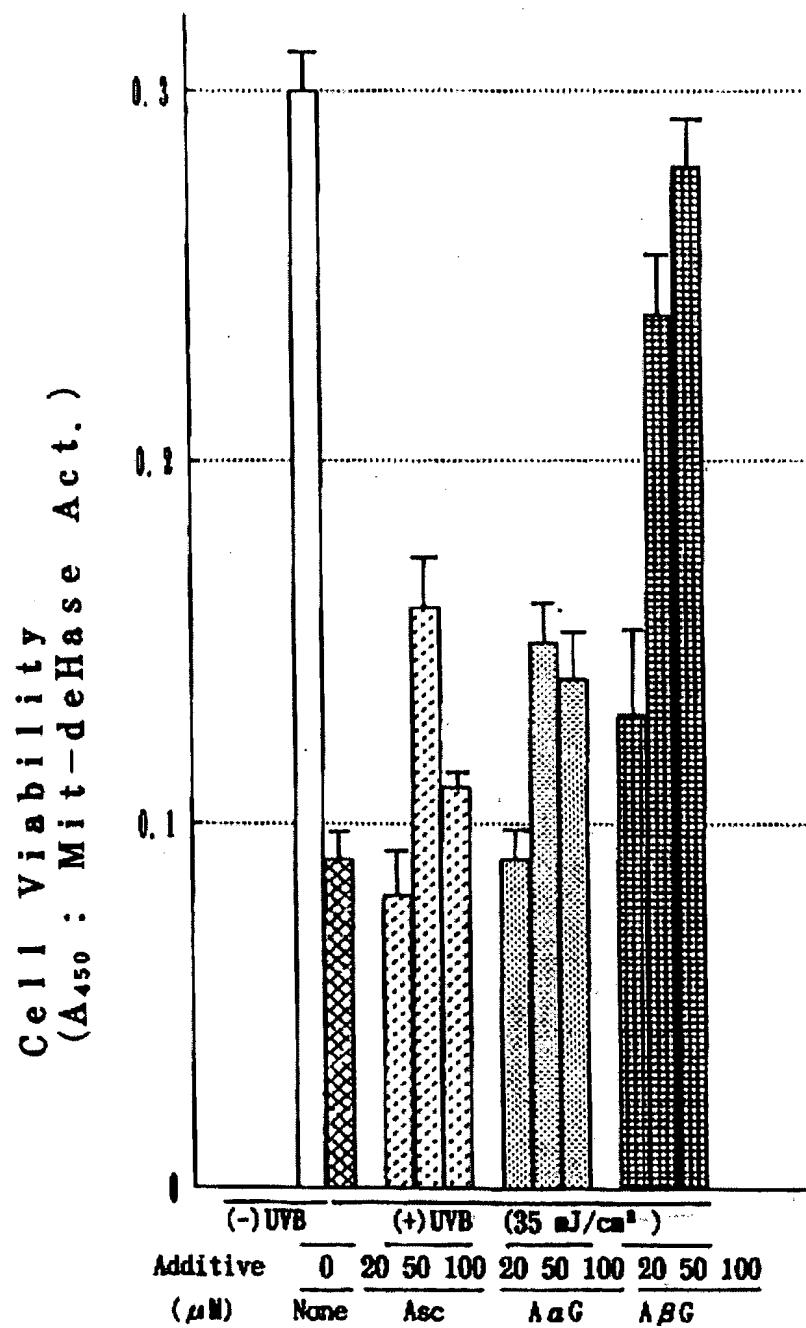
【図1】 紫外線B波(UVB)照射によるヒト皮膚表皮由来の角化細胞(HaCAT)の細胞死に対する2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の保護効果を示す。

【図2】 ヒト皮膚角化細胞での細胞内アスコルビン酸濃度に対する2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の効果を示す。

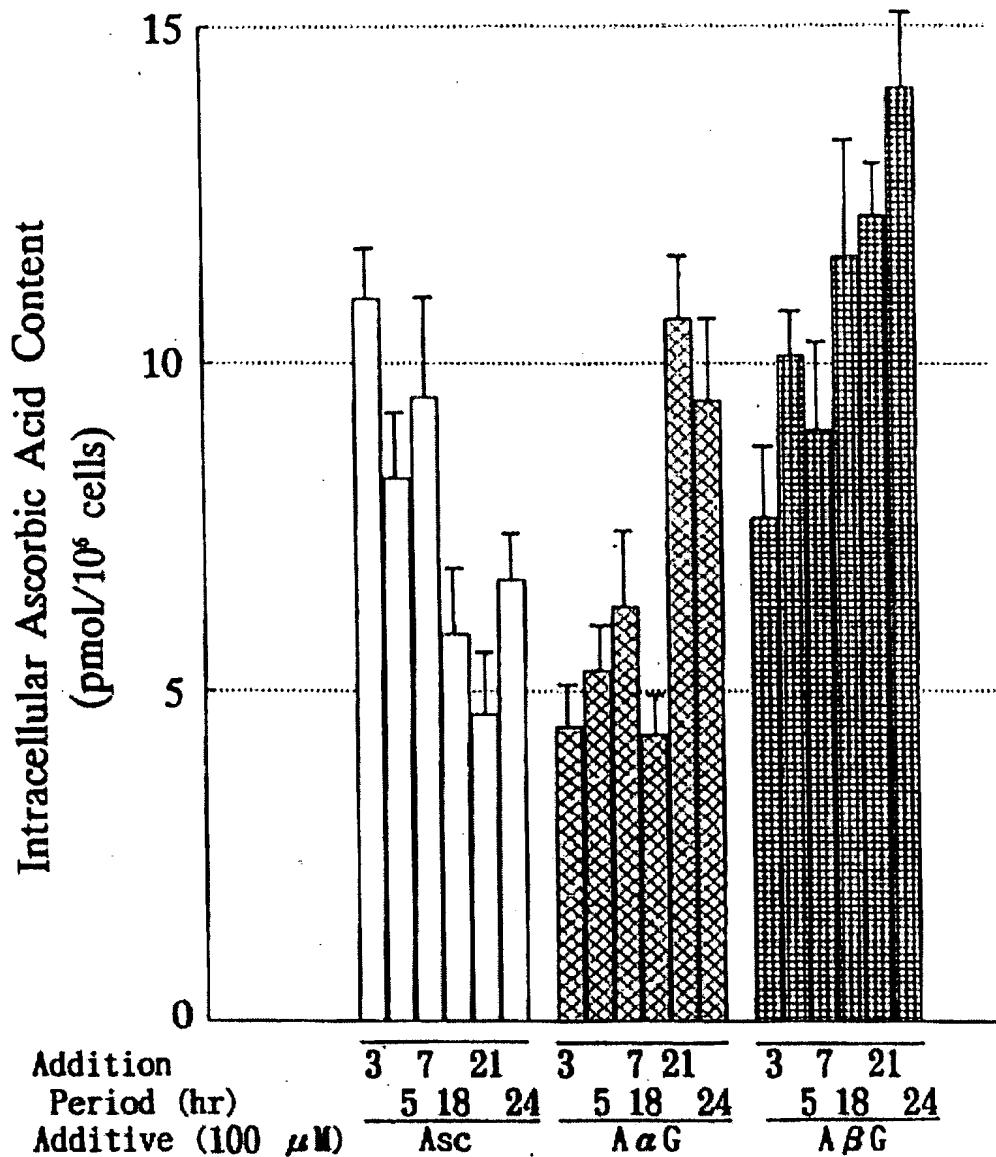
【図3】 ヒト皮膚真皮由来の纖維芽細胞(NHDF)のコラーゲン合成に関する2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸の促進効果を示す。

【書類名】 図面

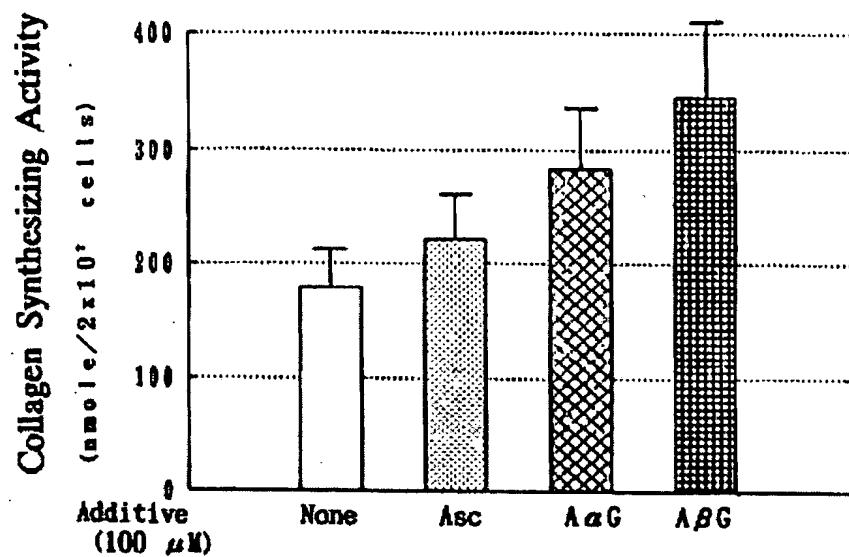
【図 1】



【図2】



【図3】



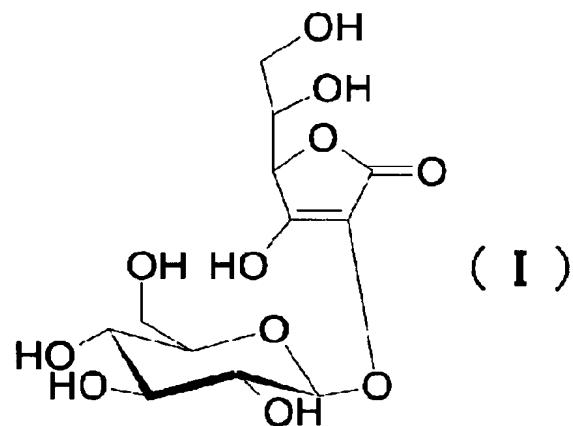
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安定性に優れ、生体内で持続的に利用され、抗酸化作用が強く、皮膚刺激性が少ないアスコルビン酸誘導体を含み、皮膚浸透性が優れた皮膚外用組成物を提供することを課題とする。

【解決手段】 式(I)で示される2-O-(β -D-グルコピラノシリ)アスコルビン酸またはその人体に安全な塩もしくはエステルと麹菌又はその処理物を含有することを特徴とする外用組成物。

【化3】



【選択図】 なし

特願 2003-183610

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月 13日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社
2. 変更年月日 2009年 4月 8日
[変更理由] 名称変更
住 所 变更
東京都港区台場二丁目3番3号
氏 名 サントリー酒類株式会社